

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-509096

(43) 公表日 平成11年(1999) 8月17日

(51) IntCl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 15/09

Z N A

C 1 2 N 15/00

Z N A A

1/21

1/21

C 1 2 P 21/00

C 1 2 P 21/00

C

// (C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:07)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-505426
(86) (22) 出願日 平成8年(1996) 7月4日
(85) 翻訳文提出日 平成10年(1998) 1月7日
(86) 国際出願番号 P C T / D K 9 6 / 0 0 3 0 4
(87) 国際公開番号 W O 9 7 / 0 3 1 8 5
(87) 国際公開日 平成9年(1997) 1月30日
(31) 優先権主張番号 0 8 0 6 / 9 5
(32) 優先日 1995年7月7日
(33) 優先権主張国 デンマーク (D K)

(71) 出願人 ノボ ノルディスク アクティーゼルスカ
ブ
デンマーク国, デーヨー-2880 バグスバ
エルト, ノボ アレ
(72) 発明者 プリースト, ファーガス, ジー.
イギリス国, スコットランド, エジンバラ
イー エイチ 14 4 エーエス, リッカ
ートン, シー/オー エリオット-ワット
ユニバーシティ
(74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胞子形成できないバチルスを用いるタンパク質の生産

(57) 【要約】

本発明は、親株を真に非胞子生殖性に変異するために、
B. サブチリスからの情報を用いることにより、胞子形
成することができないB. サブチリス以外のバチルス属
のバクテリアを得る方法を提供する。前記株は、有用な
代謝物、特に酵素のようなポリペプチドの生産のために
用いられる。

【特許請求の範囲】

1. 代謝物を生産するための方法であって、

i) 突然変異のために孢子形成できないバチルス属のバクテリアであって前記代謝物の生産に関連するポリペプチドをコードするDNA 構成物を含むバクテリアを、前記DNA 構成物の発現及び前記代謝物の産生を導く条件下で培養するステップと、

ii) 前記代謝物を回収するステップと、
を含み、但し前記バクテリアはB. サブチリス種に属さないことを特徴とする方法。

2. 前記バクテリアが、B. リケニホルミス、B. レントゥス、B. アミロリクエファシエンシス、B. トゥリンギエンシスを含む種の群に属することを特徴とする請求項1に記載の方法。

3. 前記突然変異が、Spo 2 変異、Spo 3 変異、Spo IIAC変異を含む突然変異の群から選択されることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。

4. 前記突然変異が不可逆的であることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の方法。

5. 前記代謝物が内因性又は外因性ポリペプチドであることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の方法。

6. 前記ポリペプチドが転移されることを特徴とする請求項5に記載の方法。

7. 前記ポリペプチドが酵素であることを特徴とする請求項5又は6に記載の方法。

8. 前記酵素が工業用酵素であることを特徴とする請求項5～7のいずれかに記載の方法。

9. 前記酵素が医療用酵素であることを特徴とする請求項5～7

のいずれかに記載の方法。

10. 孢子形成過程に関連する1又は複数の遺伝子が部分的又は完全に削除されることによる突然変異のため孢子形成できないバチルス属に属するバクテリアを生産する方法。

11. 前記バクテリアが、B. リケニホルミス、B. レントゥス、B. アミロリクエファシエンス、B. トゥリングエンシスを含む種の群に属することを特徴とする請求項10に記載の方法。

12. 前記変異が、Spo 2 変異、Spo 3 変異、Spo IIAC変異を含む変異の群から選択されることを特徴とする請求項10又は11に記載の方法。

13. 前記変異が不可逆的であることを特徴とする請求項10～12のいずれかに記載の方法。

14. 突然変異のために孢子形成できないB. サブチリスを除くバチルス属に属するバクテリア。

15. 前記バクテリアが、B. リケニホルミス、B. レントゥス、B. アミロリクエファシエンス、B. トゥリングエンシスを含む種の群に属することを特徴とする請求項14に記載のバクテリア。

16. 前記変異が、Spo 2 変異、Spo 3 変異、Spo IIAC変異を含む変異の群から選択されることを特徴とする請求項14又は15に記載のバクテリア。

17. 前記変異が不可逆的であることを特徴とする請求項14～16のいずれかに記載のバクテリア。

【発明の詳細な説明】

孢子形成できないバチルスを用いるタンパク質の生産

発明の分野

本発明は、孢子形成できないように変異されているバチルス (Bacillus) 属のバクテリアを用いることにより、種々の産物、特に転位されたポリペプチドを生産するための方法、前記バクテリアを生産するための方法、及び該方法に用いられるDNA構成物に関する。

発明の背景

バチルス属のバクテリアは、医療及び種々の工業に用いるための種々のポリペプチド及びタンパク質の生産に用いられている。

例えば、バチルス・リケニホルミス (Bacillus licheniformis) 種は、アミラーゼ及びプロテアーゼのような工業的な酵素の生産のために広く用いられており、クローンされた遺伝子産物の工業的調製のための一般的な宿主である(1, 2, 3)。通常コンポストとして、かなりのトン数の消費された生物の処理の必要性を生ずるこの生物から、毎年数百トンの細胞外酵素が製造される。

環境の観点から、土壌に分散される場合にこの材料が死んでいることが重要である。これは一般に、化学薬品、放射線及び／又は熱でのそのスラッジの処理により行われる。

ほとんどの生産株はSPであるが、この表現型を生ずる障害が、ランダム変異誘発の実行中に通常導入され、未知の機能及び効能のものとなる。それゆえ廃棄生物量中に低レベルの孢子が存在する可能性が高く、そして孢子撲滅を確実にするために、よりきびしく、より高価で、そしてより環境に許容されない殺菌条件を必要とする

ことにより、滅菌過程を複雑にする。

更に、よりきびしい法律管理の生産株の導入は、十分に規定された孢子形成変異体の使用を高度に要求する。このような変異体は、好ましくは、

- (i) 孢子形成において全体的に欠陥があり、
- (ii) 完全に安定であり、孢子生殖に戻ることができず、そして、

(iii) 細胞外酵素の合成及び分泌においてその親に類似するか又はそれより優るべきである。

B. サブチリス (B. subtilis) における孢子形成の遺伝学は、現在、発展段階であり (4, 5)、そして十分にキャラクタライズされている (17, 6, 7) B. リケニホルミスの孢子形成遺伝子から、この密接に関係する B. サブチリスは同一でないなら類似した発達経路を追うであろうと思われる。

孢子形成過程に観察される最初の形態学的変化は、段階 II における非対称隔膜の合成である。最後に母細胞により包み込まれるであろうより小さな娘は、プレ孢子を生じさせる。母細胞及び成熟中の孢子における遺伝子発現は、一時的かつ空間的に配向した様式で孢子形成特異的プロモーターを RNA ポリメラーゼに翻訳させるシグマ因子のカスケードの規則正しい合成及び活性化により部分的に管理される (4, 5)。

Spo IIAC 遺伝子の産物である σ^F タンパク質 (8, 9) は、プレ分裂細胞中に存在するが、その活性はプレ孢子に制限され、隔膜形成後にのみ明らかになる上述のシグマ因子の 1 つである (14)。このシグマ因子は区画特異的遺伝子発現の確立のために重大であり (10)、それがないと、発達中の孢子中の多数の遺伝子の発現が防が

れる。 σ^F の主な機能は、発達中の孢子における遺伝子発現の原因であるプレ孢子特異的シグマ因子 σ^G の発現の活性化である (11)。更に、母細胞における遺伝子発現の原因であるフロー σ^E の σ^E への処理も、Spo IIAC 内のナンセンス変異によってブロックされる。Spo IIAC 遺伝子の欠失は、 σ^E 依存である孢子の発達の全体的崩壊及び母細胞発達の遮断をおそらく導き得るだろう。

これらの理由のため、及び以前の研究が、Spo IIAC 変異体が B. サブチリスにおける細胞外酵素合成にほとんど影響を与え得ないことを示唆する (15, 16) ことから、本発明者らは、B. リケニホルミスにおける欠失のための標的としてこれを選択した。

発明の概要

本発明は、転位したポリペプチドを生産するための方法であって、

i) 突然変異のために孢子形成できないバチルス属のバクテリアであって、前記代謝物の産生に関連するポリペプチドをコードするDNA構成物を含むバクテリアを、前記DNA構成物の発現及び前記代謝物の産生を導く条件下で培養し、

ii) 前記代謝物を回収する

ことを含み、但し、前記バクテリアはB. サブチリス種に属さないことを特徴とする方法を提供する。

本発明は、更に、変異のために孢子形成できないバチルス属の宿主バクテリア、及び該宿主を生産するための方法を提供する。

本方法は、孢子形成過程に関連する1又は複数の遺伝子の欠失を可能にするためのB. サブチリスから供される情報の使用に基づく。

Spo IIAC遺伝子の欠失を、オーバーラップ伸長技術によるスブラ

イシングを用いて試験管内で調製した。この遺伝子を温度感受性プラスミドにおいてバチルス・リケニホルミス内に導入し、そして組込み及び染色体からの除去の後、染色体遺伝子の正確に位置した欠失を調製した。

変異されたバクテリアは全体的に無孢子生殖であり、細胞の極における非対称の隔膜を特徴とする不稔性の非孢子形成細胞を形成した。定性プレートテストは、バクテリアが通常のレベルのDNase、ポリガラクトツロネートリアーゼ、プロテアーゼ、RNase及びキシラナーゼを合成したが、 β -1, 3-グルカナーゼによる加水分解ゾーン及びカルボキシメチルセルラーゼ活性が親株と比較して変異体で減少したことを示した。

72時間の長時間のインキュベーションの間、変異体及び親のバッチ培養においてアルカリプロテアーゼの合成は同じであったが、 α -アミラーゼ産生量は、変異体で約30%削減された。

この研究において、我々は、規定された遺伝子欠失を調製するために、B. リケニホルミスにおいて生体内組換えを用いることができ、そしてSpo IIACの欠失が、孢子形成が全体的かつ安定して欠損し、なおセリンプロテアーゼの通常の合成を保持しているがアミラーゼ合成が少し削減された株を発生させることを示す

。

本発明は、*B. リケニホルミス*において例示されるが、本発明は更に他のバチルス、例えば*B. レントゥス* (*B. lentus*)、*B. アミロリクエファシエンス* (*B. amyloliquefaciens*)、*B. トウリングエンシス* (*B. thuringiensis*)、*B. アルカロフィルス* (*B. alcalophilus*)、*B. メセンテリクス* (*B. mesentericus*)等に用いることができることが考えられる。

表及び図面の簡単な記載

表1は、バチルス・リケニホルミスの検出されたSpo IIAC対立遺伝子を有するpE194tsの切除度数を示す。

図1は、Spo IIAにおいて欠失を形成するのに用いたオーバーラップ伸長によるスプライシングを示す。

A. 用いたプライマーの詳細（図は、プライマーA、B、C、Dの3'-末端のヌクレオチド位置を示す）。

B. 欠失された株(DN286 Spo IIACD3)からのプライマーA及びDを用いて形成されたPCR産物を配列決定することにより得られたSpo IIAC遺伝子の配列。

図2は、Spo IIACにおいて欠失を作り出す組込み及び切除反応を示す。

図3は、不稔性非孢子形成表現型を示すSpo IIAC欠失変異体の培養物からの典型的な細胞の薄断片を示す。

図4は、*B. リケニホルミス* DN286 及びDN286 Spo IIACD3における増殖、孢子形成及び細胞外酵素合成を示す。

A及びB；各々最小培地及び脳心臓注入物における株DN286の増殖(■)及び孢子(□)並びにDN286 Spo IIACD3の増殖(●)。

C及びD；各々最小培地及び脳心臓注入物における株DN286(■)及び本DN286 Spo IIACD3(●)によるセリンプロテアーゼ合成。

E；最小培地(□、○)及び脳心臓注入物(■、●)における株DN286(□)及びDN286 Spo IIACD3(○)におけるアミラーゼ合成。

発明の詳細な記載

上述の通り、本発明は、転移したポリペプチドを生産するための方法であって

i) 突然変異のため孢子形成できないバチルス属のバクテリアであって前記代謝物の生産に関連するポリペプチドをコードするDNA

構成物を含むバクテリアを、前記DNA 構成物の発現及び前記代謝物の生産を導く条件下で培養し、

ii) 前記代謝物を回収する

ことを含み、但し前記バクテリアはB. サブチリス種に属さないことを特徴とする方法を提供する。

本発明によれば、前記バクテリアは、B. リケニホルミス (B. licheniformis)、B. レントゥス (B. lentus)、B. アミロリクエファシエンス (B. amyloliquefaciens)、B. トウリングエンシス (B. thuringiensis) 等を含む種からなる群に属することが好ましい。

本発明の方法は、Spo IIAC遺伝子の欠失により孢子形成を不能にされているバチルスの使用により例示されるが、不可逆的に孢子形成過程を有効に破壊するいずれの他の変異も、例えばSpo 2 -変異及びSpo 3 -変異も本発明に含まれる。

上述のように、本発明の方法は、好ましくは、前記変異が不可逆的であるバクテリアを利用する。

本発明の方法は、主としていずれかのポリペプチド、特に転移されたポリペプチドの生産のために用いられることが考慮される。

前記ポリペプチドはそのバクテリアに対して内因性でも外因性でもよく、それは、もとのポリペプチドが各々それ自体で又は特定の他の生物により生産されることを意味する。

しかしながら、本発明の孢子形成欠損株は、二次代謝物の生産に用いることができることも考えられる。

本発明の方法からの生成物は、好ましくは、酵素、特に工業用酵素例えばプロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼ、オキシドレダクターゼ、アミラーゼ等である。

本発明の方法により生産できる他の生成物は、医療用酵素である

。

用語“転移ポリペプチド”とは、発現されたポリペプチドが、それが細胞膜を横切って転位されるのを可能にするシグナル配列を有することを示すことを意図する。特に、転移ポリペプチドは、分泌されるポリペプチド又は問題のバチルス細胞の分泌メカニズムに関連するポリペプチドであり得る。

本発明は、孢子形成過程に関連する1又は複数の遺伝子が部分的又は完全に欠失されることによる突然変異のため孢子形成できないバチルス属に属するバクテリアを生産する方法も提供する。

遺伝子組込み及び切除は、B. サブチリス及び他のグラム陽性バクテリアにおいて特定の変異を作り出すための一般的手順である(10, 24, 25)。ここで、我々は、B. リケニホルミスのような他のバチルスの染色体内に所定の変異を導入するための有効な手順であることを示す。

B. サブチリスとB. リケニホルミスとの間の密接な関係を仮定すれば(26)、その染色体内への遺伝子の導入のために異種対立遺伝子を用いる可能性を検査することに関心があった。この方法において、本発明によれば、B. リケニホルミスのような他のバチルスにおけるゲノム操作のためにB. サブチリスからの大量の配列決定された遺伝子を用いることが可能である。相同性は、たとえ相同反応より低い頻度であっても、B. リケニホルミスのSpo IIAC対立遺伝子の、B. サブチリス染色体への組込みに十分であり、そしてこれらの組込み物は非孢子生殖性であるので組込みはおそらく正確な部位でおこっている。

しかしながら、B. サブチリス宿主における切除は、組込みクロスオーバー点における第2部位組換えにより一定におこり、欠失物は回収されなかった。おそらく、この領域における高い相同性が組

換えのホットスポットを導入し、結果として全ての子孫(いくつかの組込み物から検査された少なくとも2000)が完全なSpo IIAC遺伝子を保持した。

逆の状態はB. リケニホルミスにおいて適するようであり；そしてB. リケニホルミス染色体内へ組込まれたB. サブチリス遺伝子は、完全に削り取るだろう

。

B. サブチリス及びB. リケニホルミスが同様の発達経路をたどることを仮定すると、B. リケニホルミスにおけるSpo IIAC中の欠失の結果は、B. サブチリスモデルの範囲で議論することができる。実際、B. サブチリスのSpo IIAC変異体に見られるのに極めて似た不稔性非孢子形成性細胞へのB. リケニホルミスDN 286 Spo IIACD3の分化(4)は、全体的にこの仮定を支持する。

細胞外酵素は、一般に、指数増殖の後期及び孢子形成の段階II前の定常期早期に合成される(27)。それゆえ、Spo IIACの変異は、これらの遺伝子の発現にほとんど又は全く影響がないことが予想され、そして実際、解釈できない β -グルカナーゼの例外はあるが、プレートテストは、親株と比較して、変異体における細胞外酵素生産量の大きな変化はないことを示した。

隔膜形成(septation)が完全になる前に発現される遺伝子Spo IIA細胞内で発現されるだろう。これは、全ての段階0遺伝子及びいくつかの段階II遺伝子並びに調節遺伝子、例えばabr B, hpr, sen 及びsinを含む(12)。その少なくとも9の独立した遺伝子又はシステムが存在するB. サブチリスにおけるapr E発現に影響を与えるほとんど又は全ての制御(12)は、早期の定常期の現象であり、おそらくSpo IIAC変異体において有効に機能する。次に、変異体におけるセリンプロテアーゼ合成のパターン及び酵素収率は、図4に示すように、その親のものに適合するだろう。実際、B. サブチリ

スにおけるセリンプロテアーゼ合成についての同様の結果が、規定されない非孢子生殖性変異体を用いてArbidgeら(13)により報告されている。

amy Eの発現は、apr EよりB. サブチリスにおいてはるかに少ない調節遺伝子を必要とする、代謝物抑制及びDegSUシステムは、sen(28)及びpai(29)も関連するが、この遺伝子のための主な調節システムである(12)。なぜアミラーゼの合成がSpo IIAC変異により影響を受けないかは直ちに明らかではない。

早期孢子形成シグマ因子 σ^H は、その遮断が σ^F 及び σ^E 合成を防ぐのでSpo IIA変異体内に蓄積することが可能である；前者は欠失のためであり、そして後者は、前駆体pro- σ^E からの活性 σ^E 産生が σ^F 依存性であるためである(11)。

実際、Spo IIA変異体における σ^H の蓄積の増加についての証拠がある(Errih

gton; J; personal communication) 。これにより、 α -アミラーゼ収率の減少は、 $E-\sigma^A$ の $E-\sigma^H$ による部分的な置換のためであり得る。

本発明の主な目的の1つは、工業的酵素生産の目的に適したバクテリアを提供することである。本明細書に記載される変異体は、研究室条件下で全体的に非孢子生殖性であり、孢子形成の分子生物学は、それが内生孢子を作り出すことができないことを予測する。約400bpを貫く欠失の逆転の見込みは最小であり、抑制が問題となり得る証拠はない。最後に、本バクテリアは、例えばアルカリプロテアーゼ合成において、その親と同等である。

材料及び方法

株及び増殖条件

DN286 はバチルス・リケニホルミス野生型株である。

B. リケニホルミス NCIMB6346 はNCIMB から利用できる。

バチルス・サブチリス168 は、D. A. Smith (University of Birmingham, UK) から得た。

大腸菌JM83を、全てのプラスミド作製のために用いた。

ルリア (Luria) ブイヨン及びルリアブイヨン寒天 (16) を、適切な抗生物質：アンピシリン (100mg/ml) 及びエリトロマイシン (1 mg/ml) を選択して慣用的に用いた、スピジゼンの (Spizizen's) 最小塩培地 (16) 、シャエフェーの (Schaefer's) 孢子形成培地 (16) 、及び脳心臓注入 (BHI) ブイヨン (Oxoid) も用いた。インキュベーションは、他に指示がない限り 37℃で行った。

プラスミド

大腸菌JM83におけるクローニングのためにプラスミドpUC19 を用いた。

pUC13 内でクローンされたB. リケニホルミスからの完全なSpo IIA オペロンは、M. Yudkin (University of Oxford, UK) よりご提供頂いた。

複製のための温度感受性であるpE194 の変異体であるpE194ts は、P. Youngman (University of Georgia, Athens, Ga, USA) よりご提供頂いた。

DNA 操作

ほとんどの方法はSambrookら (18) に従うか又は以前に記載される (21) 。DN

A をアガロースゲルから切除し、精製した後、Gene-Clean IIキット (Bio 101 Inc.) を用いて連結した。ABI373A DNA シーケンサーを用いて、Department of Molecular Medicine, King College, University of London, UKにより供された自動DNA シーケンシングサービスを用いてPCR 産物のDNA 配列決定を行った。シーケンシングプライマー配列番号：1：

5' - CGATCATGGAAAATTCATGGATG - 3'

は、公開される配列 (17) の塩基 943~966 に相当する、提案される組換え連結部分の上流約100 塩基の領域に相補的であった。

酵素アッセイ

酵素分泌の定性的評価は、以前に記載されたプレート検出法に基づいている (22)。

基質としてアゾカゼインを用いて培養上清においてアルカリプロテアーゼをアッセイした。リン酸カリウム緩衝液 (50mM, pH9.0, 1 ml) 及び培養上清 (1.0ml) を、3 分、37℃で平衡化し、リン酸緩衝液中0.8 %アゾカゼイン溶液0.5 mlを加えることによりその反応を開始した。適切な時期に、0.5 ml反応混合物を0.5 mlの氷冷20%TCA で沈殿させ、その混合物を遠心し、そしてその上清の吸光度を405nm において測定した。活性は、上清のml当り分当りの吸光度の変化として表される。37℃においてPhadebasアミラーゼ基質 (Pharmacia) を用いて、培養上清中でアミラーゼをアッセイし、Phadebas及びNelson-Somogi 還元糖アッセイによりアッセイされたアミラーゼの希釈液で作製された標準曲線を用いて、可溶性デンプンからの還元糖 (マルトース) の遊離に変換した。単位は、ml遊離マルトース当量/分/ml上清である。全てのバッチ培養を少なくとも2 回行った；供される図は、結果の再現パターンを表す。

電子顕微鏡法

炭素源として0.5 %マルトースを含む最小培地中で増殖した細胞を遠心により収集し、50mM NaCl を含む10mM Tris 緩衝液pH8 で洗浄した。細胞を酢酸ウラニル水溶液で染色し (4 %で2 時間)、Robards 及びWilson (23) に従って、クエン酸鉛で対比染色した。薄断片を、Jeol 100S 透過顕微鏡下で見た。

実施例

実施例 1

Spo IIACの欠失の調製

オーバーラップ伸長反応によるスプライシング (SOE) を用いた (19)。Spo I
IAC遺伝子のプロモーター近位領域を、プライマー A (配列番号：2)：

5' - GCGGCGAATTCAGCTTGACCCGACGATGGATGAACTG - 3'

及び B (配列番号：3)：

5' - CACGACCTCTTCTGAACTGAAGTTCTTTCATTTCATGGTCTTTAAGCTG - 3'

との反応で増幅し、そして Spo IIAC 遺伝子のプロモーター遠位領域を、プライマ
ー C (配列番号：4)：

5' - GACCATGAAGTGAAAGAACTTCAGTTCAGAAGAGGTCGTGATGGCC - 3'

及び D (配列番号：5)：

5' - GCGGCGGATCCTGCCTGCAACATGAGCAGCCTCAGC - 3'

との分離反応において増幅した。

プライマー A 及び D 中の下線の配列は、各々 Eco RI 及び Bam HI 部位を表す。そ
の反応混合物は、200ng のテンプレート DNA (B. リケニホルミスのクローン化 S
po IIA オペロン)、100pmol の各々のプライマー、最終濃度 125mM の各々の dNT
P, 6 ml の $MgCl_2$ (25mM)、10ml の ($\times 10$) Taq 緩衝液、及び全部で 100ml となる
量の滅菌 Millipore 水を含んでいた。

増幅プログラムは、10分間、95℃での変性の後、1ユニットの Taq ポリメラー
ゼ (Promega) を加える最初のサイクルからなり、そしてその反応混合物は軽鉱
油 100ml でカバーされる。この後、2分間、95℃での変性、2分間、55℃でのア
ニールリング、及び3分間、72℃での伸長の35サイクルが行われる。95℃12分、55
℃/2分及び72℃/6分の伸長ステップの更なるサイクルでプログラムを完了し
た

。

464 及び 382bp PCR 産物を、エタノール沈殿により濃縮し、Gene-Clean キット
を用いて精製し、SOE 反応 (上述と同じ条件) におけるプライマー A 及び D と共

に、テンプレート（各々300ng）として用いてフラグメントADを含む806塩基対S_{po} IIAC欠失物を形成した。

実施例 2

バチルス・リケニホルミス及びB. サブチリスへの欠失の導入

フラグメントADを、プライマーA及びD内に含まれる各々Bam HI及びEco RI制限部位を通してpUC19内にクローンし、大腸菌JM83内に形質転換し、そして挿入物と共にプラスミドを含むコロニーを、40mg/mlのX-galを含むLBアンピシリンプレート上でスクリーニングした。

次に、クローンからの組換えプラスミドを、前者をウシ腸のアルカリホスファターゼで処理した後に、各々のレプリコン内の特有のPst I部位を通してpE194tSに連結した。連結混合物を大腸菌JM83内に形質転換し、その組換え体を、ミネー調製物のアガロースゲル電気泳動により検出した。次に、大腸菌から調製されたプラスミドを用いて、B. リケニホルミスDN286 (10) のプロトプラスト及びB. サブチリス168 (20, 7) のコンピテント細胞を形質転換した。

pE194 ベースの欠失されたS_{po} IIAC対立遺伝子を含む、B. リケニホルミス及びB. サブチリスを28℃で、エリトロマイシンを含む50ml LBブイオン内で一晚、増殖させた。サンプルを希釈して、エリトロマイシンを含む3 mlの軟質寒天と混合し、LB寒天Emプレート上に積層し、28℃（複製を許容）及び40℃（非許容性）でインキュベートした。組込みの頻度は、非許容性の温度において増殖するものに対する許容性の温度で増殖するコロニーの数の比であった。次に、40℃で単離された組込み物を37℃でルーチンのように増殖させた。

組込まれたプラスミドの切取りを、抗生物質選択のないLBブイオン中で30℃で細胞を増殖させることにより行った。希釈したサンプルをLB寒天上にプレートし、37℃で一晩、インキュベートして、コロニー複製物をエリトロマイシンを含む及びそれを含まないLB寒天上にプレートした。切取りのEm^rコロニーの数に対するコロニーの総数の比として決定した。

実施例 3

S_{po} IIACにおける欠失の調製

B. リケニホルミスの Spo IIAC 遺伝子中の欠失を、オーバーラップ伸長によるスプライシング (SOE) 技術を用いて調製した。材料及び方法に記載されるプライマーを用いて、クローンされた Spo IIA オペロンから、2つの独立したPCR増幅を行った。1つの産物 (AB) は、下流遺伝子 (Spo IIAB) の遠端及び Spo IIAC 遺伝子の近位領域を含んでいた。第2の産物 (CD) は、Spo IIAC の遠位領域及び上流非コード化領域の部分をカバーしていた。プライマーB及びC中の相同 (オーバーラップ) の伸長領域を用いて、産物AB及びCDを含み、プライマーA及びDを組み込む第3のPCR増幅を開始した。これは、372bpの欠失を含む Spo IIAC 遺伝子の端を含むフラグメントを生じた。(フラグメントAD、図1参照)。

フラグメントADをpUC19内にクローンし、各々のレプリコン内の特有の Pst I 部位を通してpE194tsに連結してシカトルプラスミドpHMM2 (図2) を作り出し、大腸菌に形質転換した。次に、大腸菌から調製されたプラスミドを用いてB. リケニホルミスDN286のプロトプラスト及びB. サブチリス168のコンピテント細胞を形質転換した。各々の形質転換体からのクローンがpHMM2を含むことを制限酵素分析により確認し、組込み及び切取りのために用いた。

実施例4

欠失された Spo IIAC 対立遺伝子の組込み及び切取り

pHMM2を含むB. リケニホルミス及びB. サブチリス細胞を、28℃で一晩、増殖させて選択 (Em含有) 及び非選択培地上にプレートし、45℃でインキュベートした。45℃においてエリトロマイシンプレート上で増殖することができた細胞の割合として評価した組込み頻度は、B. リケニホルミスについて約 10^{-4} 及び (B. リケニホルミス対立遺伝子を含む) B. サブチリスについて100倍低かった (表1)。28℃で培養することによる組込まれたプラスミド内のローリングサークル複製の活性化の後に、いくつかの組込み物をプラスミドの切取りについてテストした時、その頻度は、B. リケニホルミスについて $10^{-2} \sim 10^{-3}$ であった。

表 1

バチルス・リケニホルミスの欠失 Spo IIAC 対立遺伝子を有する pE
194ts の切取り頻度

生物	Inte- grant 組込み	増殖 期間 (時間)	テストし たコロニ ーの数	切取り 頻度	Spo ⁻ コロニー
B. リケニ ホルミス	1	24	150	9×10^{-2}	0
	2	24	100	2×10^{-2}	0
	3	24	150	6×10^{-2}	44
	4	24	150	7×10^{-2}	20
	5	24	150	5×10^{-2}	25
B. サブチ リス	1	24	560	1×10^{-1}	0
		48	114	2×10^{-1}	0
	2	24	358	1×10^{-1}	0
		48	152	2×10^{-1}	0
	3	24	442	2×10^{-1}	0
		48	184	3×10^{-1}	0

2つのコロニー（組込み体1及び2）において、切取りは組込み部位を通して一定であり、野生型、Spo⁺子孫を回収した。しかしながら、他の3つのクローンについて、切取りはEm^r誘導体において Spo IIAC 遺伝子の欠失を生ずる第2の部位の組換えを通してであった（図2参照）。興味深いことに、その挿入はB. サブチリスにおいて極めて不安定であったが、一定の切取りが挿入点において起こり、48時間の長い増殖期間の後でさえ Spo⁻子孫は回収されなかった（表1）

実施例 5

B. リケニホルミス DN286 Spo IIACD3 のキャラクタリゼーション

B. リケニホルミス組込み体3（表3）からの欠失株を更なる研究のために選択した。野生型及びEco RIで切断されている欠失株が

らのサザンプロットされた染色体DNAへの、B. リケニホルミスからの標識された Spo IIA オペロンのハイブリダイゼーションは、親の4.2kbと比較して変異体で3.8kbのより小さいハイブリダイズするフラグメントを示した（データは示さない）。プライマーA及びDを用いる変異体及び親株の染色体DNAからのPCR増幅は、その変異体が約370bpの欠失を処理したことを示した。その変異体からのPCR産物を配列決定した時、プライマーB及びCの間の連結点に正確に位置した欠失が示された（図1B）。電子顕微鏡により、Spo IIA 変異体の形態学的確認を行った。B. サブチリス Spo IIAC 変異体の典型である“不稔性非孢子形成体”細胞中の2つの非対称隔膜が明らかに見られた（図3）。

その欠失は、孢子を検出することができない実完に非孢子生殖性培養物を生じた。BHI、最小培地（図4）及びSchaeffer's 孢子形成培地（データは示さない）での72時間の増殖の後、その親の孢子形成頻度は各々の場合、約2%であった。

同じ3つの条件下で90%~100%の孢子形成を示したB. リケニホルミス NCIM B6346と比較することにより、DN286の自然の低い孢子形成比率を確認した。

いずれの培地中でも、Spo IIAD3 誘導体において孢子は検出されなかった。孢子の欠如にかかわらず、BHI中で増殖させた場合、その変異体における生存性の大きな損失又は細胞溶解についての証拠はなく、その細胞集団は、インキュベーション期間全体を通して約 4×10^9 cfu/mlで安定して維持された。しかしながら、最小培地において、変異体を36時間を超えてインキュベートした場合、生存性がいくらか損失し、その最終的細胞集団は、10倍高いピークの後、 3×10^8 cfu/mlに達した。生存性の損失は、最小培地で増殖する親におけるものより低かった。

実施例 6

B. リケニホルミス DN286 Spo IIACD3 における細胞外酵素合成

最初のプレートテストは、変異体株が、合成された細胞外酵素の量において親といくら異なることを示すことを示唆した。特に、 β -1, 3-グルカナーゼ及びカルボキシメチルセルラーゼからの加水分解ゾーンは、親株と比較して変異

体で削減されたが、 α -アミラーゼ、DNase、ポリガラクトネートリナーゼ、プロテアーゼ、RNase及びキシナーゼの合成は大きく影響を受けなかった。

変異体及びその親を、72時間、豊富な(BHI)及び最小培地中で増殖させた。胞子形成及びセリンプロテアーゼの合成をモニターした(図4)。プロテアーゼ産生量は親及び変異体の両方で同様であった。最小培地において、酵素収率は、両方の株において約40時間のインキュベーション後にピークに達し、その後安定して続いた。BHIにおいて、酵素収率は少し抑制され、両方の株において約48時間のインキュベーション後にピークに達した。酵素収率のその後の減少は、塩培地よりBHI培地で低かった。両方の培地において、セリンプロテアーゼの収率は、Spo IIAC欠失により影響を受けなかった。

α -アミラーゼ合成は、親と比較して、変異体のバッチ培養の間、一貫してより遅く開始し、結果として、これらの発酵は、プロテアーゼのものより長時間、続いた(84時間)。両方の培地において、変異体からの酵素の収量は、親から得られたものの約70%であった。しかしながら、その酵素収量を生物量の単位当りの特異活性として表すと、変異体は、特に生物量が最小培地中で減少する時の増殖サイクルの後期において、その親とほぼ同様であった。

本発明は、その実施形態を示すのみである実施例を通して詳説される。これは、多くの他の実施形態が当業者に明らかであろうから

、本発明を限定するものとして解釈されるべきでない。

明細書中の参考文献

1. Diderichsen, B., G. B. Poulsen and P. L. Jorgensen, 1991.
Cloning and expression of a chromosomal alpha-amylase gene from *Bacillus stearothermophilus*. Res. Microbiol. 142: 793-796.
2. Leen, R. W. van, J. G. Bakhuis, R. F. W. C. van Beckhoven, M. Bruge, L. C. J. Dorssers, R. W. J. Hommes, P. J. Lemson, B. Noordam, N. L. M. Persoon and G.

- Wagemaker. Production of human-interleukin 3 using industrial microorganisms. *Bio/Technol.* 9: 47-52.
3. de Boer, A. S., F. Priest and B. Diderichsen. 1994. on the industrial use of *Bacillus licheniformis*: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 595-598.
 4. Errington, J. 1993. *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis *Microbiol. Rev.* 57: 1-33.
 5. Lewis, P. J., S. R. Partridge and J. Errington. 1994. Sigma-factors, asymmetry and the determination of cell fate in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3849-3853.
 6. Kuroda, A., Y. Asami and J. Sekiguchi. 1993. Molecular cloning of a sporulation-specific cell wall hydrolase gene of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175:6260-6268.
 7. Coppelecchia, R., H. de Grazia and C. P. Moran Jr. 1991. Deletion of *spIIAB* blocks endospore formation in *Bacillus subtilis* at an early stage. *J. Bacteriol.* 173:6678-6685.
 8. Sun, D. P. Stragier, and P. Setlow. 1989. Identification of a new sigma factor involved in compartmentalized gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 3: 141-149.
 9. Fort, P., and P. J. Piggot. 1984. Nucleotide sequence of sporulation locus *spoIIA* in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2147-2153
 10. Tangney, M., P. L. Jorgensen, B. Diderichsen and S. T. Jorgensen, 1995. A new method for integration and stable

- DNA amplification in poorly transformable bacilli. *FEMS Microbiol. Letts.* 125:107-114.
11. Partridge, S. R., D. Foulger and J. Errington. 1991. The role of s^F in prespore-specific transcription in *Bacillus subtilis*. *Molec. Microbiol.* 5: 757-767.
 12. Smith, I. 1993. Regulatory proteins that control late-growth development, p. 785-800. In A. L. Sonenshein, R. Losick and J. A. Hoch(ed.), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 13. Arbridge, M. V., B. A. Balthus, J. Schultz and D. Crabb. 1993. Fermentation of *Bacillus*, p. 871-895. In A. L. Sonenshein, R. Losick and J. A. Hoch(ed.), *Bacillus subtilis and Other Gram-Positive Bacteria: Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 14. Waites, W. M., D. Kay, I. W. Dawes, D. A. Wood, S. C. Warren and J. Mandilestam. 1970. Sporulation in *Bacillus subtilis*. Correction of biochemical events With morphological Changes in asporogenous mutants. *Biochem. J.* 118: 667-676.
 15. Coote, J. G. 1992. Sporulation in *Bacillus subtilis*. Characterization of oligosporogenous mutants and comparison of their phenotypes with those of asporogenous mutants. *J. Gen. Microbiol.* 71: 1-15.
 16. Harwood, C. R. and S. M. Cutting. 1990. Appendix 1 - media, p. 545-550. In, C. R. Harwood and S. M. Cutting

- (eds.) *Molecular Biological Methods for Bacillus*. Wiley, Chichester, UK.
17. Yudkin, M. D., L. Appleby and A. J. Smith. 1989. Nucleotide sequence of the *Bacillus licheniformis* homologue of the sporulation locus *spoIIA* of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 135: 767-775.
 18. Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
 19. Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen and L. R. Pease. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene*. 77: 61-68.
 20. Cutting, S. M. and P. B. Van der Horn. 1990. Genetic analysis, p. 27-74. In: C. R. Harwood and S. M. Cutting (eds.). *Molecular biological methods for Bacillus*. Wiley, Chichester, UK.
 21. Aquino de Muro, M., W. J. Mitchell and F. G. Priest. 1992. Differentiation of mosquito-pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* from non-toxic varieties by ribosomal RNA gene restriction patterns. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1159-1166.
 22. Priest, F. G. and R. Grigorova. 1990. Methods for studying the ecology of endospore-forming bacteria. *Meth. Microbiol.* 22: 565-591.
 23. Robards, A. W. and A. J. Wilson(eds.). 1993. *Procedures in electron microscopy*. Wiley, Chichester, UK.
 24. Youngman, P. 1990. Use of transposons and integrational

- vectors for mutagenesis and construction of gene fusions in *Bacillus subtilis*, p. 221-226. In, C. R. Harwood and S. M. Cutting(eds.). Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley & Sons, New York.
25. Biswas, I., A. Gruss, S. D. Ehrlich and E. Maguin. 1993. High efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 175: 3628-3635.
26. Priest, F. G. 1993. Systematics and ecology of *Bacillus*. p. 3-16. In A. N. Sonenshein, R. Losick and J. A. Hoch (eds.) *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington D. C.
27. Priest, F. G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.*
28. Wang, S. L., L. F. Wang and R. H. Doi. 1988. Cloning and nucleotide sequence of *senN* a novel *Bacillus natto* (*B. subtilis*) gene that regulates expression of extracellular protein genes. *J. Gen. Microbiol.* 134: 3264-3276.
29. Honjo, M., A. Nakayama, K. Fukazawa, K. Kawamura, K. Ando, M. Mori and Y. Furutani. 1990. A novel *Bacillus subtilis* gene involved in negative Control of sporulation and degradative enzyme production. *J. Bacteriol.* 172: 1783-1790.

配列表

(2) 配列番号 : 1 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 24塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : 他の核酸

(Xi) 配列の記載 : 配列番号 : 1 :

CGATCATGGA AAATTTTCATG GATG

24

(2) 配列番号 : 2 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 37塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : 他の核酸

(Xi) 配列の記載 : 配列番号 : 2 :

GCGGCGAATT CAGCTTGACC CGACGATGGA TGAAC TG

37

(2) 配列番号 : 3 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 配列の長さ : 49塩基対

(B) 配列の型 : 核酸

(C) 鎖の数 : 一本鎖

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 分子の型 : 他の核酸

(Xi) 配列の記載 : 配列番号 : 3 :

CACGACCTCT TCTGAACTGA AGTTCTTTCA CTTCATGGTC TTTAAGCTG

49

(2) 配列番号：4の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：46塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の型：他の核酸

(Xi) 配列の記載：配列番号：4：

GACCATGAAG TGAAAGAACT TCAGTTCAGA AGAGGTCGTG ATGGCC

46

(2) 配列番号：5の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：46塩基対

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の型：他の核酸

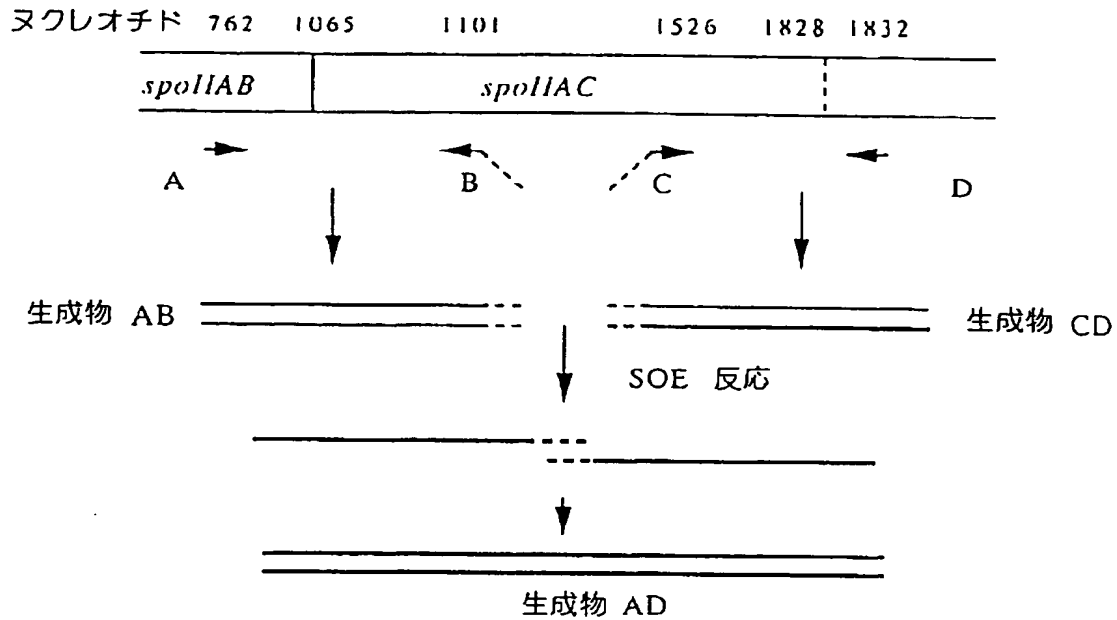
(Xi) 配列の記載：配列番号：5：

GACCATGAAG TGAAAGAACT TCAGTTCAGA AGAGGTCGTG ATGGCC

46

【図1】

A. SOE 反応



B. 配列

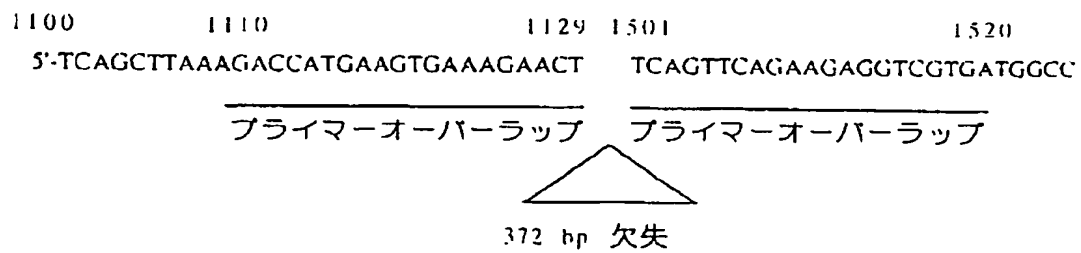


FIG. 1

【図2】

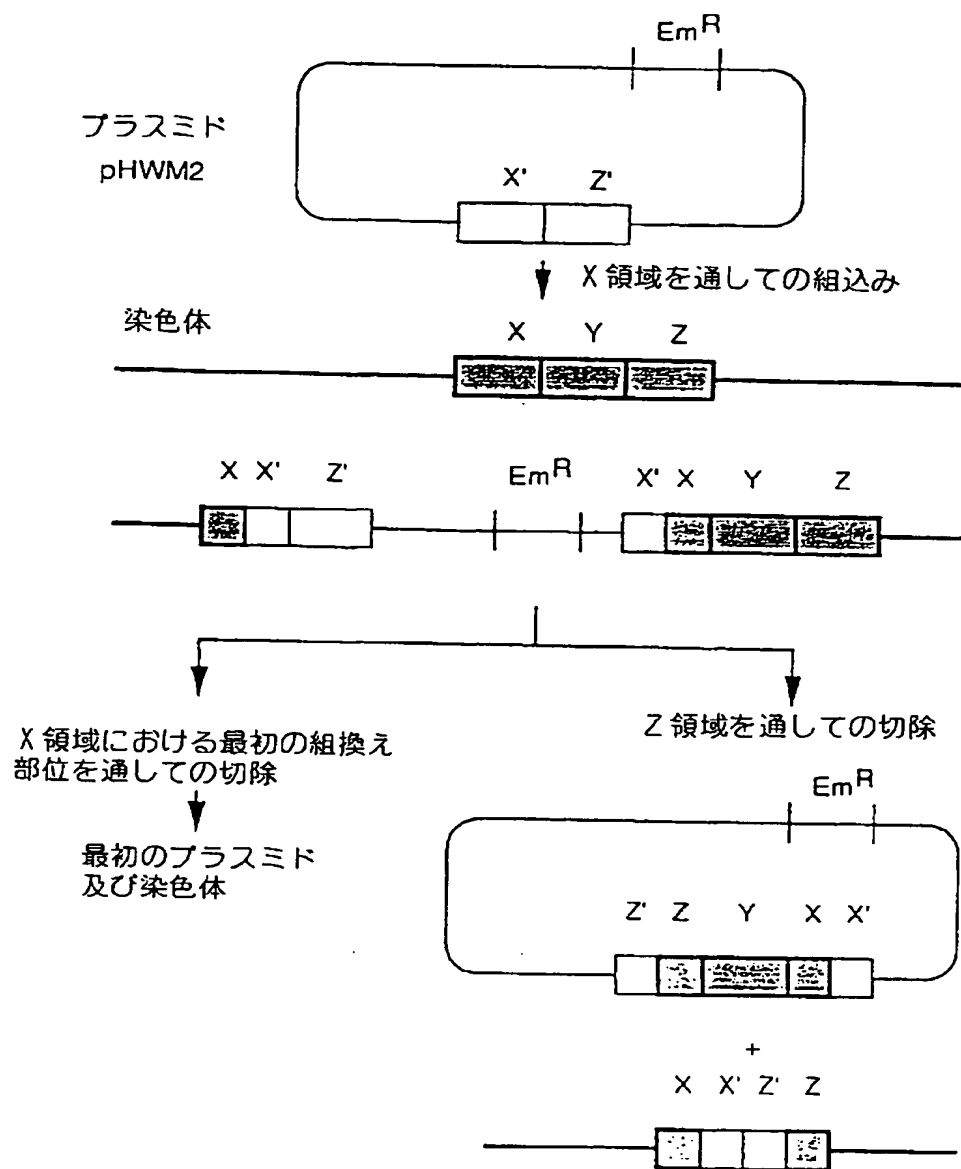


FIG. 2

【図3】

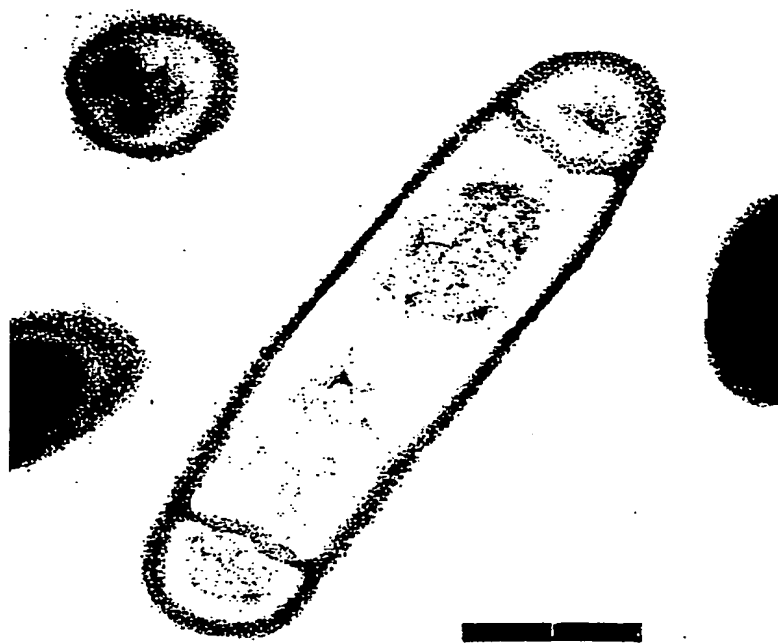


FIG. 3

【図4】

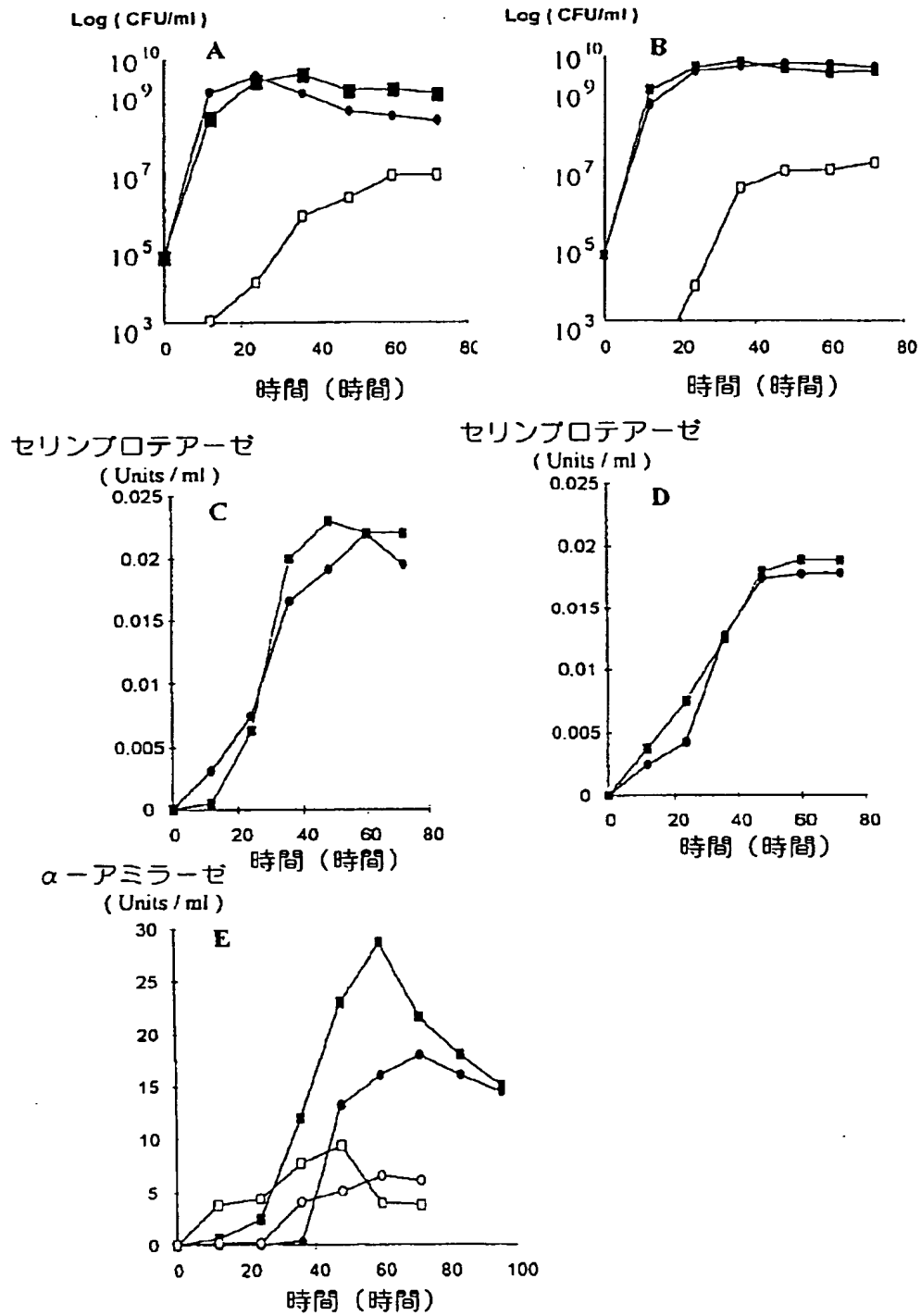


FIG. 4

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK 96/00304

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC6: C12N 1/21, C12N 9/00, C12P 21/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC6: C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
SE,DK,FI,NO classes as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
EPODOC, PAJ, WPI, MEDLINE, BIOSIS, DBA, CA, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Dialog Information Services, File 34, SciSearch, Dialog accession no. 14311191, Fleming AB et al: "Extracellular Enzyme-Synthesis in a Sporulation -Deficient Strain of Bacillus-Licheniformis"; Applied and Environmental Microbiology, 1995, V61, N11 (NOV), p 3775-3780 --	1-17
X	EP 0369817 A2 (BIOTECHNICA INTERNATIONAL, INC.), 23 May 1990 (23.05.90), page 1, line 50 - line 54; page 2, line 10 - line 13, claims --	1-17
X	WO 8904866 A1 (CELLTECH LIMITED), 1 June 1989 (01.06.89), claims -- -----	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
4 October 1996		17.10.96
Name and mailing address of the ISA/ Swedish Patent Office Box 5055, S-102 42 STOCKHOLM Facsimile No. +46 8 666 02 86		Authorized officer Patrick Andersson Telephone No. +46 8 782 25 00

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

05/09/96

International application No.

PCT/DK 96/00304

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A2- 0369817	23/05/90	AT-T- 137265	15/05/96
		AU-A- 4476689	24/05/90
		CA-A- 2003078	18/05/90
		DE-D- 68926333	00/00/00
		JP-A- 3067582	22/03/91
WO-A1- 8904866	01/06/89	AU-A- 2727388	14/06/89
		EP-A- 0351427	24/01/90
		JP-T- 2502247	26/07/90

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶ 識別記号 F I

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:10)

(C 1 2 P 21/00

C 1 2 R 1:07)

(C 1 2 P 21/00

C 1 2 R 1:10)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72)発明者 フレミング, アラステア, ビー,

イギリス国, スコットランド, エジンバラ
 イー エイチ 14 4 エーエス, リッカ
 ートン, シー/オー エリオット-ワット
 ユニバーシティ

(72)発明者 タンジェニー, マーティン

イギリス国, スコットランド, エジンバラ
 イー エイチ 14 4 エーエス, リッカ
 ートン, シー/オー エリオット-ワット
 ユニバーシティ

(72)発明者 ジョージャンセン, バー, リナ

デンマーク国, デーコー-2880 バグスバ
 エルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク
 アクティーゼルスカブ

(72)発明者 ディダーシェン, ボーシュ

デンマーク国, デーコー-2880 バグスバ
 エルト, ノボ アレ, ノボ ノルディスク
 アクティーゼルスカブ